



TITLE:

大腸菌の酸化ストレスセンサー SoxRSレギュロンに関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

中山, 貴之

CITATION:

中山, 貴之. 大腸菌の酸化ストレスセンサーSoxRSレギュロンに関する研究. 京都大学, 2017, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20207>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	中山貴之
論文題目	大腸菌の酸化ストレスセンサーSoxRSレギュロンに関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>活性酸素種は好気呼吸の副産物として生じ、DNAやタンパク質、脂質などの細胞構成要素に損傷を与えるため、細胞や個体の老化の主要な要因と考えられている。ある種の抗生物質や、免疫系による能動的な産生によっても活性酸素種が生じるため、バクテリアは様々なストレス応答機構を備えている。SoxRSは、活性酸素種の1つであるスーパーオキシドのセンサーであり、酸化ストレス防御に関与する数十の遺伝子の発現を制御している。本研究は、バクテリアの酸化ストレス防御への理解を深めることを目的とし、SoxRS制御下にある遺伝子の中で、(i) 酸化ストレス誘導性の意義が不明な遺伝子 (<i>ydbK</i>遺伝子) ; (ii) 機能が不明な遺伝子群 (<i>pqiABC</i>オペロン) について解析を行った。第2章で取り上げたYdbKは、ピルビン酸を基質として還元力を産生する pyruvate-flavodoxin oxidoreductase (PFOR)と高い相同性を示す。既知のPFORは酸素によって容易に失活する性質を持ち、SoxRSにより誘導されることと矛盾する。YdbK過剰発現細胞からは高いPFOR活性が検出された。しかし、<i>ydbK</i>遺伝子欠損株が酸化ストレスに高感受性を示すことから、酸化ストレス条件下でも機能することが示唆された。遺伝子発現制御解析の結果、<i>ydbK</i>遺伝子の酸化ストレス誘導にはタイムラグがあることが明らかになった。タイムラグの原因として、<i>ydbK</i>遺伝子プロモーター内のSoxS結合部位が、コンセンサス配列との相同性が低いことが挙げられる。以上より、YdbKは、先に発現した酵素群に守られながら、酸化損傷から回復する段階で働くというモデルを提唱した。第3章で取り上げたSoxRS制御遺伝子<i>pqiABC</i>は、機能不明な膜タンパク質群をコードしており、飢餓条件下でも誘導されることが報告されている。大腸菌にはホモログである<i>yebST</i>オペロンも存在するが、2つのオペロンを同時に欠損させても、ストレスに対して感受性は検出できなかった。データベース解析の結果、レジオネラ菌において、<i>pqiBC</i>がABCトランスポーターとオペロンを形成していることが明らかになり、PqiABCが膜脂質の輸送に関与するという仮説が立てられた。PqiAのアミノ酸配列には、既知のトランスポーターと相同性が見られない。しかし、膜トポロジー解析の結果、PqiAは、トランスポーターに最も多く見られる内膜6回膜貫通タンパク質であることが明らかになった。また、PqiB、PqiCタンパク質は、内膜-外膜間を橋渡しする複合体を形成することが明らかになり、トランスポーターに基質を運ぶタンパク質であることが示唆された。さらに、PqiABCの過剰発現は、Mla輸送体（リン脂質輸送体）の欠損株が示す膜ストレス感受性を相補し、<i>pqiABC</i>、<i>yebST</i>の欠損は、Mla変異体の膜ストレス感受性を増大させた。これらの結果から、PqiABC、YebSTは、膜の安定性に重要な膜輸送系であると結論付けた。基質は特定できてい</p>			

ない

が、発現のストレス誘導性を考慮すると、基質となる物質が細胞損傷の予防や治療に利用できる可能性が期待される。

（論文審査の結果の要旨）

酸素分子は、呼吸鎖における電子の受容体として、好気性生物の生存に必須のものである。通常、酸素分子は4つの電子を受け取り水分子に還元されるまで酵素複合体中に保持されるが、部分的な還元が生じた場合、活性酸素種として知られる反応性が高い化合物が発生する。この様な副産物としての活性酸素種の発生が不可避であることに加え、免疫細胞やある種の抗生物質の殺菌作用にも活性酸素種が関与するため、バクテリアの酸化ストレス応答を研究することは、基礎研究の枠を越え医学・薬学の分野にも重要である。

近年では、スクリーニング技術の発達により、ストレス条件下で誘導される遺伝子群の同定は容易となった。しかし、大腸菌の遺伝子の約半数はまだ機能不明であり、また、機能がわかっていても、ストレス条件下での役割が不明な場合も多い。スクリーニングから得られたデータを最大限に活用するには、個々の遺伝子の機能を遺伝学的な手法で解析することが必要となる。そこで、本研究で、申請者は大腸菌の酸化ストレスセンサーの1つであるSoxRSレギュロンについて取り上げ、その制御下にある遺伝子群に関する解析を行った。

申請論文の2章で取り上げたYdbKタンパク質はSoxSによって誘導されるにもかかわらず、酸素によって容易に失活するPFOR（ピルビン酸フラボドキシン酸化還元酵素）活性を持つ。また、2012年に他のグループが発表した論文では、*ydbK*遺伝子上流にはSoxS結合サイトが見当たらないと論じられていた。申請論文では、細胞抽出液中の酵素活性測定から、YdbKが確かにPFOR活性を有することと、*ydbK*遺伝子欠損株の酸化剤高感受性から、酸化ストレス抵抗性に寄与することがわかった。*lacZ*レポーター遺伝子を用いた発現制御解析から、SoxSによるYdbKの誘導にはタイムラグが存在することが明らかになり、これによって、活性酸素による失活を回避していると考えられる。申請者の研究から、精製SoxSタンパク質を用いた*in vitro*での解析から、SoxSタンパク質は*ydbK*遺伝子上流配列に結合することが明らかになった。このSoxS結合部位はコンセンサス配列との相同性が低く、これが上記のタイムラグの原因になっていると申請者は推測している。以上の結果で示されたように、申請者は、Ydbkの酸素高感受性とSoxS結合配列が見付からないという2つの矛盾を解決した。

本研究の3章で取り上げた膜タンパク質群PqiABCは、SoxSによって発現が制御されることが1995年に報告されたが、タンパク質の機能は不明なままであった。これらの機能を解析することで、新しい酸化ストレス防御機構が明らかになることが期待される。データベース解析の結果、ヒトの病原菌であるレジオネラ菌において、PqiB、PqiCがABC

トランスポーターと共に働くことが予測されたが、PqiAのアミノ酸配列からは、既知のトランスポーターとの相同性を見いだすことは出来なかった。しかし、申請者は、PqiAの構造を解析した結果、ABCトランスポーターに最も多く見られる内膜6回膜貫通構造であることを明らかにした。また、PqiB, PqiCが、内膜・外膜の間を橋渡しする複合体を形成していることを証明したが、これは膜輸送に適した構造といえる。申請者は、欠損株が膜ストレスに高感受性を示すことに加え、PqiABCの過剰発現がMla輸送系の変異体が生ずる膜ストレス感受性を相補することを明らかにしている。さらに、*pqiABC*のパラログである*yebST*オペロンの膜ストレス誘導性を示した。以上の申請者の研究から、これまで機能不明であったPqiABCは膜輸送系を形成しており、膜ストレス抵抗性に寄与する物質の輸送を行っていることが明らかになった。

申請者の研究は、酸化ストレス防御因子の機能解明に大きく貢献するものであり、学術的に非常に価値のあるものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年1月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、全文公表となる。

要旨公表可能日： 年 月 日以降